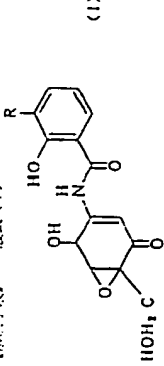


| (5)Int.Cl. <sup>8</sup>        | 種別記号             | 片内整理番号               | P I           | 特許表示箇所 |
|--------------------------------|------------------|----------------------|---------------|--------|
| C 07 D 303/38                  | ABG              | ABG                  | C 07 D 303/38 | ABG    |
| A 61 K 31/335                  |                  |                      | A 61 K 31/335 |        |
| C 12 P 17/02                   |                  |                      | C 12 P 17/02  |        |
| // (C 12 P 17/02)              |                  |                      |               |        |
| C 12 R 1:01                    |                  |                      |               |        |
| 審査請求 承継者 請求項の範囲 3 O L (全 15 頁) |                  |                      |               |        |
| (21)出願番号                       | 特開平8-190249      | (71)出願人              | 000173013     |        |
| (22)公開日                        | 平成8年(1996) 7月29日 | 財団法人微生物化学研究会         |               |        |
|                                |                  | 東京都品川区上大崎3丁目14番23号   |               |        |
|                                |                  | 竹内 富雄                |               |        |
|                                |                  | (72)発明者              |               |        |
|                                |                  | 東京都品川区東五反田5丁目1番11号 二 |               |        |
|                                |                  | ユーブジマンシヨン701         |               |        |
|                                |                  | (72)発明者              |               |        |
|                                |                  | 土田 外志夫               |               |        |
|                                |                  | 神奈川県相模原市矢部2丁目3番24号 ハ |               |        |
|                                |                  | (72)発明者              |               |        |
|                                |                  | 一モ二矢部201号            |               |        |
|                                |                  | (72)発明者              |               |        |
|                                |                  | 中村 光                 |               |        |
|                                |                  | (74)代理人              |               |        |
|                                |                  | 東京都台東区入谷2丁目20番地9号    |               |        |
|                                |                  | 弁護士 八木田 茂 (外2名)      |               |        |
|                                |                  | 最終頁に続く               |               |        |

(54)【発明の名称】 抗生物質エポキシノマイシンCおよびDとその製造法ならびに抗リウマチ剤

(57)【要約】  
【課題】 抗リウマチ活性を有し且つ新しい分子構造を有する新規な化合物を提供することを目的とする。  
【解決手段】 一般式 (1)



(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、エポキシノマイシンDでは塩基を示す)で表わされるエポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンDは新規な抗生物質としてアミコラトブシス sp. MK299-9 54株の培養により得られた。エポキシノマイシンCおよびD、あるいはそれらの塩は抗リウマチ活性を有する抗生物質である。また、先に得られた新規な抗生物質であるエポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBも抗リウマチ活性を有することが見いだされた。

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗リウマチ活性を示す新規化合物であるエポキシノマイシンE[epoxylin oalicin] CおよびエポキシノマイシンD、あるいはこれらの塩に、またエポキシノマイシンCおよび(または)エポキシノマイシンDの製造法に関する。さらには本発明は、エポキシノマイシンCおよび(または)エポキシノマイシンD、エポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBまたはそれらの塩のうちの少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗リウマチ剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 種々な数の抗腫瘍性物質が知られており、また種々な数の抗腫瘍性物質が知られている。他方、従来のリウマチ治療には、ステロイド剤、線形抗炎症剤または免疫調節剤等が使われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 細菌感染症の化学療法において、従来知られまたは使用されている既知の抗腫瘍性化合物とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗腫瘍性を示す新しい化合物の発見または創製することは常に望まれている。また抗腫瘍性物質は、一般に強い毒性を有するもので多く、毒性が低く且つ新規な化学構造を有する抗腫瘍性物質を発見または創製することが常に望まれており、そのための研究が行われている。

【0004】 また、従来のリウマチ治療で用いられたステロイド剤および免疫調節剤には、種々の副作用があることが問題であり、また時性抗炎症剤は付随療法である。新規な抗リウマチ剤を提供することにある。

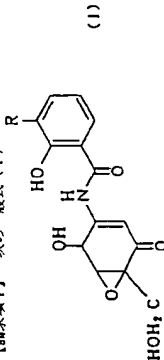
【0005】

【課題を解決するための手段】 先に、本発明者らは、抗腫瘍性および抗腫瘍活性を持つ新規な抗生物質を提供することを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と実用化の研究を促進してきた。その結果、土壌菌から新規な微生物としてアミコラトブシス属に属する菌株を分離することに成功し、またこの菌株について命名されたアミコラトブシス sp. MK 299-954株が新しい構造を持つ種々の抗生物質を生産していることを見出した。これら新規な抗生物質を単離することに成功し、それらにエポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンBと命名した。更に、これらの新規な抗生物質が薬剤耐性菌(メチシリン耐性菌等)をふくむグラム陽性の細菌に抗菌活性を示し、また癌細胞の増殖を抑制する抗腫瘍活性を有することを見出した(平成7年12月4日出願の特願平 7-315542号明細書参照)。

【0006】 更に、本発明者らは研究を進めたが、その

【特許請求の範囲】

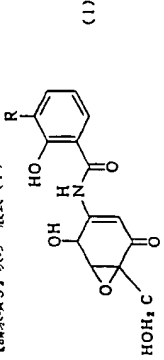
【請求項1】 次の一般式 (1)



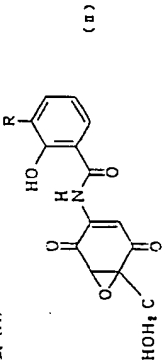
(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシノマイシンDでは塩基を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンD、またはそれらの塩。

【請求項2】 アミコラトブシス属に属する、請求項1に記載のエポキシノマイシンCおよびDの生産菌を、培養地に培養し、その培養物からエポキシノマイシンCおよび(または)Dを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシノマイシンCおよび(または)エポキシノマイシンDの製造法。

【請求項3】 次の一般式 (1)



(式中、RはエポキシノマイシンCでは水素原子を示し、またエポキシノマイシンDでは塩基を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンD、ならびに次の一般式 (11)



(式中、RはエポキシノマイシンAでは塩基原子を示し、またエポキシノマイシンBでは水素原子を示す)で表わされる化合物である抗生物質エポキシノマイシンAおよびエポキシノマイシンB、あるいはこれらの塩から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分として含有することを特徴とするリウマチ剤。

【発明の詳細な説明】

(式中、RはエポキシキノマイシンDでは水素原子を示し、またエポキシキノマイシンDでは酸素原子を示す)で表わされる化合物であるエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンD、あるいはこれらの塩が提供される。

【0010】エポキシキノマイシンCおよびDは、弱酸性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム塩などの有機塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、これらの塩も上記の抗リウマチ活性を有する。

【0011】次に、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDの理化学的性質を記載する。

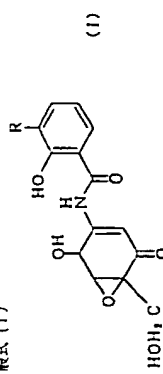
- (1) エポキシキノマイシンCの理化学的性質
- A) 外觀及び性質：白色粉末、弱酸性物質
- B) 融点：168-172℃ (分解)
- C) 比旋光度： $(\alpha)_D^{25} + 128^\circ$  (c 1.0, メタノール)
- D) T.L.CのRf値：0.31
- シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

結果、アミコラプトシス菌に属する菌のエポキシキノマイシンAおよびB生産菌は、エポキシキノマイシンAおよびBと化学構造が共通するが別個の新規な化合物2種を生産していることを見いだした。今回、これら新規な化合物2種を単離することに成功し、それぞれにエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDと命名した。

【0007】また、本発明者らは、微生物の代謝産物の中から抗リウマチ活性を示す物質を探索する研究を継続行なっていたので、今回発見したエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDが抗リウマチ活性を有するが研究した。その結果、本発明にかかわるエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDが慢性関節リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制することを見いだした。また、先に本発明者らが発見したエポキシキノマイシンAおよびエポキシキノマイシンBも抗リウマチ活性を有することを見いだした。これらの知見に基づいて、本発明が完成された。

【0008】なお、本発明者らが体面断断に得たエポキシキノマイシンCおよびエポキシキノマイシンDは、特定の細胞に対して弱い抗細胞活性を示したが、各種の細胞の増殖を抑制する活性がかなり低いことが認められた。

【0009】従って、第1の本発明においては、次の一般式 (1)



- E) マススペクトル (m/z) : 292 (M+H)<sup>+</sup>  
290 (M-H)<sup>-</sup>  
F) 高分解能マススペクトル：実験値 292.0821 (M+H)<sup>+</sup>  
計算値 292.0804

- G) 分子式：C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>  
H) 紫外線吸収スペクトル：  
(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 297 (17430)  
(11) 0.01N NaOH-メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図1に点線で示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 304 (18270), 304 (19750)  
(2) エポキシキノマイシンDの理化学的性質
- A) 外觀及び性質：黄かっ色粉末、弱酸性物質
- B) 融点：163-168℃ (分解)
- C) 比旋光度： $(\alpha)_D^{25} + 142^\circ$  (c 1.0, メタノール)

- D) T.L.CのRf値：0.10  
シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマト
- E) マススペクトル (m/z) : 326 (M+H)<sup>+</sup>  
324 (M-H)<sup>-</sup>  
F) 高分解能マススペクトル：実験値 326.0417  
計算値 326.0417

G) 分子式：C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub> C1  
H) 紫外線吸収スペクトル：  
(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図5に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 299 (17590)

- (11) 0.01N NaOH-メタノール溶液中で測定した吸収スペクトルは添付図面の図5に点線で示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 304 (18950), 367 (9230)
- (111) 0.01N HCl-メタノール溶液中で測定したUVスペクトルは添付図面の図5に点線で示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 297 (18530)
- I) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法) : 添付図面の図6に示す。

- J) <sup>13</sup>C-NMRスペクトル (CD<sub>3</sub>OD/TMS): 添付図面の図7に示す。  
K) <sup>1</sup>H-NMRスペクトル (CD<sub>3</sub>OD/TMS): 添付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDの生物学的性質を次に記載する。  
【0012】A) コラーゲン誘発関節炎抑制作用  
コラーゲン誘発関節炎に対する効果を1群5-8のDBA/

ガラファンで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合

- G) 紫外線吸収スペクトル：  
(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図5に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 299 (17590)

H) 紫外線吸収スペクトル：  
(1) メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルは添付図面の図5に実験値を示す。主なピークは次のとおりである。  
 $\lambda_{max}$  nm (ε) 299 (17590)

I) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法) : 添付図面の図6に示す。  
J) <sup>13</sup>C-NMRスペクトル (CD<sub>3</sub>OD/TMS): 添付図面の図7に示す。  
K) <sup>1</sup>H-NMRスペクトル (CD<sub>3</sub>OD/TMS): 添付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDの生物学的性質を次に記載する。  
【0013】エポキシキノマイシンのAおよびCの2mg/kgまたは4mg/kg、ならびにエポキシキノマイシンBの1mg/kgまたは2mg/kgを最初のコラーゲン接種の日より1週間に3回、合計6週間経過後に投与した。コラーゲン誘発関節炎の抑制効果は接種および最後の接種、腫瘍および腫瘍の程度による0-4のスコア (4肢の合計の最高点は16) により評価した。スコア0は全く症状がみられない場合、スコア1は四肢の指など小関節が1本のみ発赤、腫瘍を示す場合、スコア2は小関節が2本以上、あるいは手首、足首などの比較的大きな関節が発赤、腫瘍を示す場合、スコア3は1本の手や足の全体的な腫瘍が最大限に達し、しかも関節の腫瘍を伴っていることと判断した場合をそれぞれ示す。結果を表1に示す。  
【0014】

(表1) コラーゲン増産効果の作用

| 試験化合物      | 投与量<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ) | 一群中の<br>マウス数 | スコア                           |                               |
|------------|---|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
|            |   |              | 5週目                           | 6週目                           |
| 対照         | —   | 8            | 9.23 $\pm$ 1.25               | 8.00 $\pm$ 1.44               |
| エポキシノマイシンA | 2   | 6            | 2.00 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>  | 3.43 $\pm$ 0.70 <sup>ab</sup> |
|            | 4   | 5            | 2.00 $\pm$ 0.84 <sup>ac</sup> | 1.20 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup> |
| エポキシノマイシンB | 1   | 5            | 2.00 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>  | 2.00 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>  |
|            | 2   | 5            | 2.22 $\pm$ 0.83 <sup>ac</sup> | 3.50 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>  |
| エポキシノマイシンC | 2   | 5            | 6.40 $\pm$ 0.87               | 6.80 $\pm$ 0.97               |
|            | 4   | 5            | 1.80 $\pm$ 0.51 <sup>ab</sup> | 2.40 $\pm$ 0.92 <sup>ab</sup> |

スコア: 平均値±標準誤差

対照群との間の有意差  $^{a}p<0.05$ ,  $^{b}p<0.01$

【0015】エポキシノマイシンAの2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、エポキシノマイシンBの1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、およびエポキシノマイシンCの4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は有意に増産効果のスコアを抑制した。

【0016】B) 抗活性

本発明による抗活性物質エポキシノマイシンCおよびD

(表2)

| 試験薬                    | 最低発育阻止濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |            |
|------------------------|--------------------------------------|------------|
|                        | エポキシノマイシンC                           | エポキシノマイシンD |
| スチロコキカス・アウレウス・ス15      | 50                                   | >50        |
| スチロコキカス・アウレウス 85 0810  | 100                                  | 100        |
| スチロコキカス・アウレウス 13 16520 | 100                                  | 100        |
| バステラ・ゼリグ 49.9325       | 50                                   | 50         |

【0018】C) 発育抑制活性  
各種の発育抑制剤を用いて発育抑制剤の増産を50%抑制するエポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンDの濃度 (IC<sub>50</sub>値) を、MTT法 (「Journal of Immunology」Methods J 65巻、55-60頁(1983)参照) で測定した。その結果を表3に示す。

【0019】

(表3)

| 供試菌            | IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |            |
|----------------|--|------------|
|                | エポキシノマイシンC                                   | エポキシノマイシンD |
| マウス白血球 L1210   | >100   | >100       |
| マウス 1MCカルノーマ   | >100   | >100       |
| エーデルワイス        | >100   | >100       |
| マウス黒色腫 B16-BL6 | >100   | >100       |

【0020】D) 毒性

ICR系雄性マウスにエポキシノマイシンCおよびエポキシノマイシンDの100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与した。死亡したマウスは、また毒性症状はなかった。また、エポキシノマイシンCの4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を1週間に3回、合計6週間腹腔内に投与したが死亡したマウスはなかった。エポキシノマイシンCの毒性は非常に低い。

【0021】表2の結果から明らかなように、本発明によるエポキシノマイシンCおよびDは、特定の菌種に対して強い抗活性を示すから抗菌剤として有用である。しかし、表3の結果から明らかなように、エポキシノマイシンCおよびDは各種の発育抑制剤の増産を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で抑制しなかった。

【0022】さらに表2の本発明によれば、アミコラプシン系に属する、制菌一般式 (1) のエポキシノマイシンCおよびDの生産菌を培養した。その培養物からエポキシノマイシンCおよび (または) エポキシノマイシンDを採取することを特徴とする、抗生物質エポキシノマイシンCおよび (または) エポキシノマイシンDの製造法が提供される。

【0023】第2の本発明の方法で用いることができるエポキシノマイシンCおよびDの生産菌の一例としては、アミコラプシン sp. WZ99-95F4 株がある。この菌株は平成6年10月、微生物化学研究所において、西崎麻仙博士の土壌より分離された放線菌で、WZ99-95F4の菌株番号が付された微生物である。

【0024】このWZ99-95F4株の菌学的性状を次に記載する。

1. 形態

菌糸はよく分岐し、ジカザゲ状を呈する。また、分岐が認められる。菌糸は直線あるいは不規則な曲線で、円筒形、梨形、棒状または環状の構造に分類される。その表面は平滑であり、太さは約0.4~0.6 $\times$ 1.1~5.0 $\mu\text{m}$ である。

1.6ミクロンである。幹生性、菌糸、胞子のう及び運動性胞子は認められない。

【0025】2. 各菌種における生育状態  
色の記載について ( ) 内に示す菌種は、コンテナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラ・ハーモニー・マニアル (Contalner Corporation of America color harmony manual) を用いた。

(1) シュクロース・明塩寒天培地 (27℃培養)  
無色の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖して、溶解性色素は認められない。

(2) グルコース・アスパラギン寒天培地 (27℃培養)  
うす黄 (2ca, Lt Wheat ~ 2gc, Beakool) の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖し、溶解性色素は認められない。

(3) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (15P-培地 5、27℃培養)  
うす黄 (3le, Camel ~ 3le, Cinnamon) の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖して、溶解性色素は認められない。

(4) スターチ・無塩寒天培地 (15P-培地 4、27℃培養)  
無色の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖して、溶解性色素は認められない。

【0026】(5) グルコース寒天培地 (15P-培地 7、27℃培養)  
うす黄 (2lg, Mustard Tan) ~ 灰黄 (3lg, Adobe Brown) の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖し、溶解性色素は認められない。

(6) 寒天寒天培地 (27℃培養)  
うす黄 (2ca, Lt Wheat) の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖し、溶解性色素は認められない。

(7) イースト・寒天寒天培地 (15P-培地 2、27℃培養)  
うす黄 (3lg, Lt Amber) の発育上に、白い菌糸をうすうすと増殖し、溶解性色素は認められない。



ガラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合。  
 【0042】 E) 分子式:  $C_{10}H_{16}NO_4$  C1  
 F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

$\lambda_{max}$  nm (ε) 236 (sh, 8000), 255 (sh, 5900), 325 (8000), 370 (sh, 2700)  
 C) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)  
 $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1340, 1230

【0043】 (2) エポキシノマイシンBの理化学的性質

A) 外観及び性質: 淡黄色固体、揮発性物質  
 B) 融点: 178~184℃ (分解)  
 C) 比旋光度:  $[\alpha]_D^{25} +32.2^\circ$  (c 0.51, メタノール)  
 D) T.L.CのRf値: 0.52

シリカゲル (Art. 105715, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーで展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (10:1) で展開して測定した場合。

【0044】 E) 分子式:  $C_{10}H_{16}NO_4$   
 F) 紫外線吸収スペクトル: メタノール溶液中で測定したUV吸収スペクトルの主なピークは次のとおりである。

$\lambda_{max}$  nm (ε) 237 (6100), 253 (sh, 5400), 326 (6300)  
 C) 紫外線吸収スペクトル (KBr錠剤法)  
 $\nu_{max}$  (cm<sup>-1</sup>) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1230

【0045】 第3の本発明による抗リウマチ剤で有効成分として用いられるエポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBは、前記のとおり、慢性関節リウマチの動物実験モデルであるコラーゲン誘発関節炎を抑制する活性を有する。エポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBは、特に抗リウマチ剤として使用される場合に、それらの投与量は通常より少ないが一般に成人で日量10~200mg、好ましくは20~600mgであり、症状に応じて必要により1~3回に分けて投与するのがよい。投与方法は投与に適した形態をとることができ、特に経口投与とあるいは経腸的投与が望ましい。

【0046】 エポキシノマイシンA~Dは、前記に示すとおり、コラーゲン誘発関節炎に対する抑制作用を有するから、慢性関節リウマチのみならず、自己免疫疾患または関節として、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、結節性動脈硬化、潰瘍性大腸炎および慢性性糖尿病などの自己免疫疾患の予防または治療にも有効に適用することが期待できる。

【0047】

【発明の短縮の形態】 次に真例により本発明を更に詳

細に説明するが、本発明は下記の真例に規定されるものでない。  
 【0048】 真例1 抗生物質エポキシノマイシンCおよびDならびにエポキシノマイシンAおよびBの製造

(A) グリセリン 0.5%、シュウクロース 2%、大豆粉 1%、乾酵母 1%、コーン・スチープ・リカー 0.5%、塩化コバロト 0.001%を含む液体培地 (pH7.0に調整) を三角フラスコ (500ml容) に 100mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。これらの培地に、等量斜面培地に培養したアミコトプシス sp. MK299-95F 4株 (FERID P-15243) を接種し、その後30℃で5日間回転培養した。これにより種母培養液を得た。  
 【0049】 グリセリン 2%、デキストリン 2%、バクトンゾイトン 1%、粉末酵母エキスを 0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%、シリコーンオイル 1滴を含む液体培地 (pH7.4に調整) を三角フラスコ (500ml容) に 100mlずつ分注し、常法により 120℃で20分滅菌した。その後、これらの培地に、上記種母培養液をそれぞれ2mlずつ接種し、27℃で4日間回転培養した。

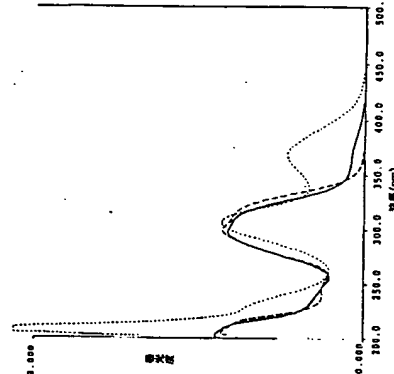
【0050】 このようにして得られた培養液を遠心分離して固体を除去した。培養液 1.8リットル (L) は、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル 1.8リットルを出して、酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾燥し、残渣をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで2回洗浄した。メタノール層を減圧下で濃縮乾燥すると茶色の油状物 (980mg) が得られた。この油状物をシリカゲルカラム (Herc k, Kieselgel 60, 120ml) に付し、トルエン-アセトン系 (10:1, 5:1, 3:1) で順次溶出するとエポキシノマイシンAが10mg、エポキシノマイシンBが19mg、エポキシノマイシンCおよびDの混合物が170mg得られた。この混合物の50mgをシリカゲルTLC (Herc k, Art. 105715, クロロホルム-10%希水メタノール=10:1で3回展開) で分離精製すると白色固体のエポキシノマイシンCが13mg得られ、また黄っぽい色粉末のエポキシノマイシンDが23mg得られた。すなわちエポキシノマイシンCが融点 168~172℃ (分解) の白色粉末として13mgの収量で得られ、またエポキシノマイシンDが融点 163~168℃ (分解) の黄っぽい色粉末として23mgの収量で得られた。

(B) なお、前記の(A)項と同様にして得られた培養液を濾過して固体を分離した。培養液 2.55リットル (L) を、6N-HClによりpH2にした後に酢酸ブチル 2.55Lを出し、酢酸ブチル層を減圧下で濃縮乾燥し、残液をメタノール50mlに溶かしヘキサン50mlで2回洗浄し、メタノール層を減圧下で濃縮乾燥した。得られた液をクロロホルム-メタノール-水 (50:10:40, 100ml

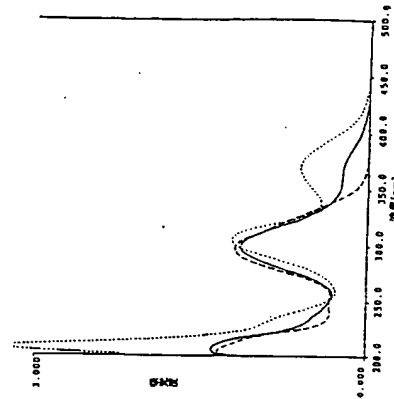
1) で分配し、下層を減圧下で濃縮乾燥すると、茶色の油状物 (0.515g) が得られた。この油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kieselgel 60, メルク社製, 50ml) に付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1) で順次溶出した。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、トルエン-アセトン混合溶媒 (50:1, 20:1, 10:1, 7:1) で順次溶出した。エポキシノマイシンAおよびBの混合物が124mg得られた。この混合物の35mgをシリカゲルTLC (展開溶媒: クロロホルム-メタノール, 20:1) にかけて分離精製した。エポキシノマイシンAが融点 168~173℃ (分解) の淡黄色粉末として20mgの収量で得られ、またエポキシノマイシンBが融点 178~184℃ (分解) の淡黄色粉末として10mgの収量で得られた。

【図面の簡単な説明】  
 【図1】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液中、0.01N HCl-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。

【図1】



【図5】



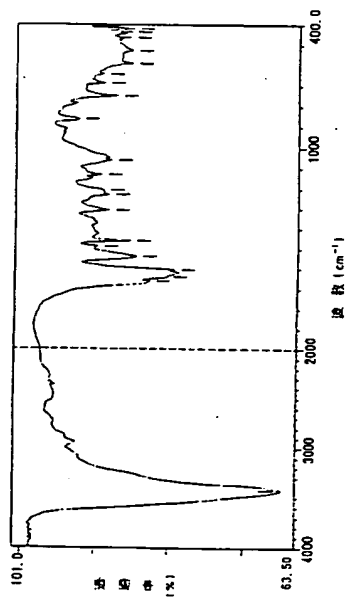
【図2】 エポキシノマイシンCのKBr錠剤法で測定した紫外線吸収スペクトルである。  
 【図3】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。  
 【図4】 エポキシノマイシンCのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。  
 【図5】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液中、0.01N HCl-メタノール溶液中および0.01N HCl-メタノール溶液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルである。  
 【図6】 エポキシノマイシンDのKBr錠剤法で測定した紫外線吸収スペクトルである。  
 【図7】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定したプロトン核磁気共鳴スペクトルである。  
 【図8】 エポキシノマイシンDのメタノール溶液 (内部標準: トリメチルシリラン) にて測定した炭素13核磁気共鳴スペクトルである。

特開平 10-45738

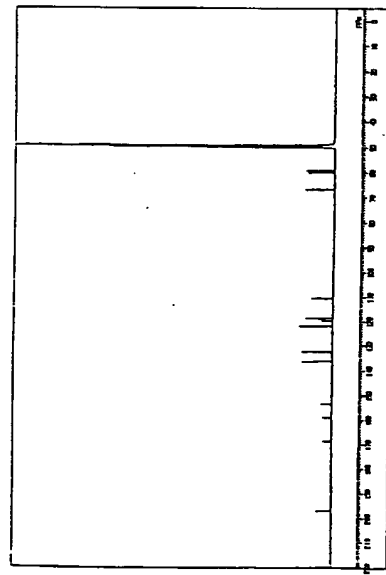
(12)

特開平 10-45738

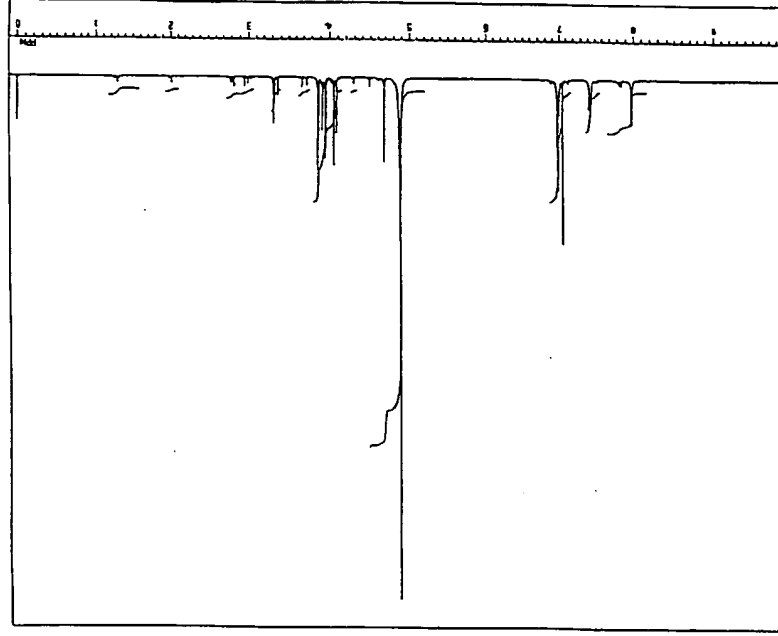
【図 2】



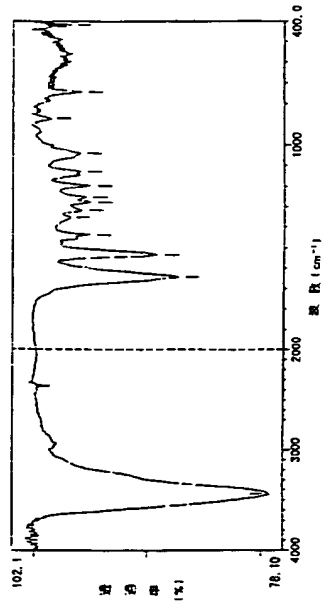
【図 3】



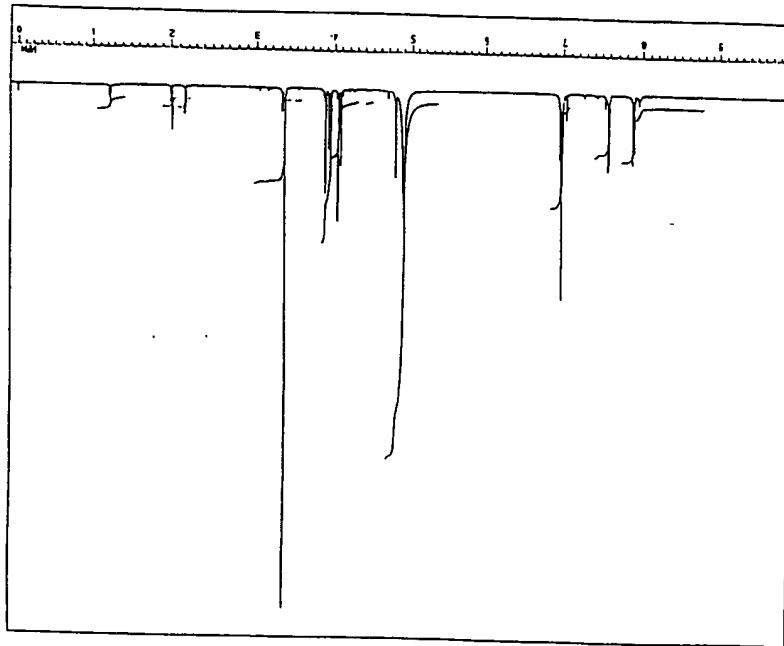
【図 4】



【図6】



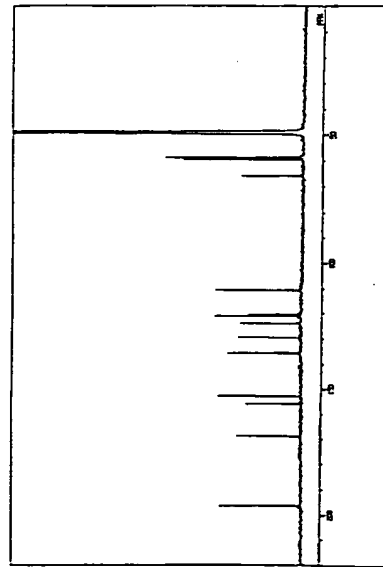
【図8】



フロントページの続き

- |         |                    |         |                                  |
|---------|--------------------|---------|----------------------------------|
| (72)発明者 | 飯沼 寛信              | (72)発明者 | 横田 雅                             |
|         | 神奈川県横浜市長区山ノ下町6番17号 |         | 東京都新宿区内藤町1番地26 秀和レジデンス405号       |
| (72)発明者 | 澤 力                | (72)発明者 | 平野 伸一                            |
|         | 神奈川県横浜市長区西町6番7号    |         | 神奈川県茅ヶ崎市本村5丁目8番1-207             |
| (72)発明者 | 森橋 博               | (72)発明者 | 松本 国樹                            |
|         | 東京都大田区田園調布北町3番17号  |         | 神奈川県横浜市長区さくらが丘11番地3 菊1グリーンコーポ102 |

【図7】



特開平10-45738

(15)

(12)発明者 石塚 雅也  
静岡県三島市西谷町6番5号 パストラル  
ハイム電話館111

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**